

REC'D 10 DEC 1999

PCT/JP 99/05420

WIPO

PCT

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

20.10.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

E U

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年10月 1日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第280380号

出 願 人
Applicant(s):

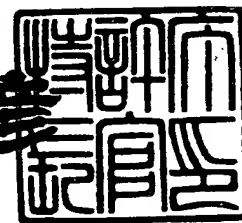
ダイキン工業株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月26日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3081595

【書類名】 特許願

【整理番号】 D2-001

【提出日】 平成10年10月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 高性能な R e c A 様組換え酵素 / 1 本鎖核酸プローブ複合体の調製方法及びその利用

【請求項の数】 21

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府摂津市西一津屋 1 番 1 号 ダイキン工業株式会社
淀川製作所内

【氏名】 木河 浩司

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府摂津市西一津屋 1 番 1 号 ダイキン工業株式会社
淀川製作所内

【氏名】 楠見 佳代

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府摂津市西一津屋 1 番 1 号 ダイキン工業株式会社
淀川製作所内

【氏名】 向井 恵吏

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府摂津市西一津屋 1 番 1 号 ダイキン工業株式会社
淀川製作所内

【氏名】 小幡 和哲

【特許出願人】

【識別番号】 000002853

【氏名又は名称】 ダイキン工業株式会社

【代表者】 井上 礼之

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高性能な RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体の調製方法及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分子数が1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、かつ、RecA 様組換え酵素の分子数の10倍以下である難分解性ヌクレオチドコファクターの存在下で、ホモプローブを含む1本鎖核酸プローブ試料と RecA 様組換え酵素とを反応させることを特徴とする、RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を調製する方法。

【請求項2】 難分解性ヌクレオチドコファクターが $ATP \gamma S$ 、 $ADP \cdot AlF_4^-$ (ATP 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は ADP 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $dADP \cdot AlF_4^-$ ($dATP$ 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は $dADP$ 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $ADP \cdot BeF_3^-$ (ATP 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は ADP 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、又は $dADP \cdot BeF_3^-$ ($dATP$ 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は $dADP$ 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ホモプローブが、互いに十分に相補的な少なくとも2種類のホモプローブである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 1本鎖核酸プローブ試料が、ホモプローブと、少なくとも1種類のヘテロプローブとの混合物である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 0.5～2.0mM の Mg^{2+} 存在下で1本鎖核酸プローブ試料と RecA 様組換え酵素とを反応させる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 RecA 様組換え酵素が原核生物由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 RecA 様組換え酵素が大腸菌由来である、請求項1に記載の方法。

方法。

【請求項 8】 RecA 様組換え酵素が標識又はリガンドを有する、請求項 1、6、7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 ホモプローブが標識又はリガンドを有する、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 請求項 1～9 のいずれかに記載の RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体の調製に用いるための、RecA 様組換え酵素及び難分解性ヌクレオチドコファクターを含むキット。

【請求項 11】 試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) 請求項 9 に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を 2 本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された 2 本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、及び

(c) 固相に捕捉されなかった 2 本鎖核酸及びプローブを除去する工程、を含む方法。

【請求項 12】 試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) 請求項 9 に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を形質転換可能なベクターに挿入された 2 本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された 2 本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、

(c) 固相に捕捉されなかった 2 本鎖核酸及びプローブを除去する工程、

(d) 固相に捕捉された 2 本鎖標的核酸を含む画分を固相から遊離し、該 2 本鎖標的核酸を含む画分を適当な宿主細胞に形質転換する工程、及び

(e) 該 2 本鎖標的核酸を有する形質転換細胞を選択する工程、を含む方法。

【請求項 13】 標識又はリガンドが、ビオチン又はジゴキシゲニンである、請求項 8、9、11、12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】 固相が、アビジン（ストレプトアビジン）又は抗ジゴキシゲニン抗体を結合させた磁性ビーズ（マグネットビーズ）である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】 請求項 8 又は 9 に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を用いる、固定細胞試料中に存在する 2 本鎖標的核酸をインサイチュハイブリダイゼーション法によって検出する方法。

【請求項 16】 請求項 1～9 のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を用いる、生細胞試料中に存在する 2 本鎖標的核酸をインビボ遺伝子ターゲティング法によってターゲティングする方法。

【請求項 17】 2 本鎖標的核酸が 2 本鎖標的 DNA である、請求項 1、11、12、15、16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】 1 価のカチオン共存下で RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体と 2 本鎖標的核酸を含む試料とを反応させることを特徴とする、請求項 11～16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】 1 価のカチオンがナトリウムイオン又はカリウムイオンである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】 ナトリウムイオンが 150mM 以下の塩化ナトリウム又は 250mM 以下の酢酸ナトリウムに由来し、カリウムイオンが 150mM 以下の塩化カリウム又は 250mM 以下の酢酸カリウムに由来する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】 請求項 1～9 のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を含む、試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮（enrichment）、検出及び／又は単離するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、RecA 様組換え酵素（リコンビナーゼ）／1 本鎖核酸プローブ複合体（single-stranded nucleoprotein filament）の調製方法、及び該方法により調製された RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体の利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

in vitro で相同組換え反応 (homologous pairing) 及び／又はDNA鎖交換反応 (strand exchange) を触媒する種々の組換え酵素タンパク質 (recombinase) が、多くの原核生物や真核生物から単離精製されている。これらの組換え酵素の中で現在までに最もよく研究されているのは、大腸菌由来の組換え酵素である RecA タンパク質である (柴田武彦、細胞工学、9、No.4、281-292、1990)。

RecA タンパク質は、in vitro において相同な1本鎖DNAと2本鎖DNA間の相同組換えを行い、相同的に対合した3重鎖DNA構造やその他の3本鎖の接合DNA分子 (joint DNA molecule) を作ることが知られている (B.Rigas ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、83、9591-9595、1986。P.Hsieh ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89、6492-6496、1992。L.J.Ferrin ら、Science、254、1494-1497、1991等)。また互いに相補的な2種類の1本鎖DNA (complementary single-stranded DNA) と、それらと相同な部位を有する2本鎖DNAとの間でダブルDループと呼ばれる4本鎖DNA構造を作ることにも知られている (E.P.Sena、Nature Genetics、3、365-372、1993。V.K.Jayasena ら、J. Mol.Biol.、230、1015、1993)。

さらに、RecA タンパク質は、DNA-DNA間の対合反応のみならず、相同なRNAとの間でDNA-RNA間の対合反応を行い得ること (D.Kirkpatrick ら、Nucleic Acids Res.、20、4339-4346 及び 4347-4353、1992) や、相同なRNA/DNAハイブリッドとの間での対合反応を行い得ることにも知られている (H.Kotani ら、Mol.Gen.Genet.、250、626-634、1996)。

このような RecA タンパク質の特性を利用して、溶液中に微量に存在する (モル比で50～数百分子に1分子の割合) 特定の2本鎖標的DNAを単離する方法 (S.M.Honigberg ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、83、9586-9590、1986。B.Rigas ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、83、9591-9595、1986。M.Teintze ら、Biochem.Biophys.Res.Comm.、211、804-811、1995。米国特許4,888,274) や、固定した細胞中の2本鎖標的核酸を検出するインサイチュハイブリダイゼーション法が開発されている (W093/05177)。

【0003】

しかしながら、試料中に極微量しか存在しない（例えばモル比で1,000分子に1分子以下の割合）ような2本鎖標的核酸分子を RecA タンパク質に代表される組換え酵素を利用してターゲティング、濃縮（enrichment）、検出及び／又は単離するためには、その目的に適したより高性能な RecA 様組換え酵素（リコンピナーゼ）／1本鎖核酸プローブ（2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む）複合体（single-stranded nucleoprotein filament）の調製法を開発し、反応効率、収率や特異性をさらに向上させる必要がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、試料中の2本鎖標的核酸に高い反応性及び特異性を示すRecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ（2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む）複合体の調製方法、並びに該方法により調製されたRecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体の2本鎖標的核酸配列のターゲティング、濃縮（enrichment）、検出及び／又は単離への利用を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

相補的な配列を有する2本鎖標的核酸と効果的に且つ特異的に安定な複合体を形成し得る安定な RecA／1本鎖核酸プローブ複合体（single-stranded nucleoprotein filament）を、ATP γ S 及び低濃度の Mg^{2+} の存在下、SSB（single-strand binding protein）非存在下で、1本鎖DNAに RecA タンパク質を反応させて調製する方法が、すでに Radding らによって開発されている（米国特許 4,888,274）。彼らは、0.5-2mM の濃度のATP γ S 存在下で行うのが好ましく、最低 0.5mM 以上必要であると述べている（同特許の7ページ及び請求項8）。

【0006】

しかし、本来 RecA タンパク質1分子に対してATP等のヌクレオチドコファクター1分子が結合すると考えられている。ATPをコファクターとして用いる場合は、RecA タンパク質自身が保有するATPase活性によってADPに分解さ

れ、RecA タンパク質／ADP複合体は1本鎖DNAから解離してしまうので、安定な RecA／1本鎖核酸プローブ複合体を形成させるためには大過剰のATPもしくはATP再生系（ホスホクレアチン+クレアチンキナーゼ等）を共存させる必要があるが、ATP γ S等のATPaseによって分解されにくいコファクターを用いる場合は、ADPに分解されて RecA タンパク質／ADP複合体となって1本鎖核酸から解離することもなく、RecA タンパク質に対するアフィニティーも非常に強いので、大過剰に加える必要はないと本発明者らは考えた。また、本発明者らはこのような観点から、ATP γ S等の該難分解性ヌクレオチドコファクターについては、反応液中での絶対的な濃度ではなく、反応中に存在する1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数や、RecA タンパク質の分子数に対して何分子程度の該難分解性ヌクレオチドコファクターが存在するのが最適かを論じるべきであると考えた。

【0007】

Radding らの米国特許 4,888,274 号明細書には、「相補的な配列を有する2本鎖標的DNAと効果的に且つ特異的に安定な複合体を形成し得る安定な RecA／1本鎖DNAプローブ複合体の形成は、0.5-2mM の Mg^{2+} 、0.5-2mM の ATP γ S、0.1-50 μ M（この場合のモル数はDNAを構成するヌクレオチド残基のモル数であり、1M=350g/l である。）の1本鎖DNA、及び1本鎖DNAの1/4量以上、好ましくは1/3量（約0.033-16.7 μ M）の RecA タンパク質存在下で行うのが好ましい」と記載されている（同特許の7～8ページ）。この場合のATP γ Sの分子数は、1本鎖DNAを構成しているヌクレオチド残基の分子数の10倍から2万倍、また RecA タンパク質の分子数の約30倍から60,000倍に相当する。また、「該 RecA／1本鎖DNAプローブ複合体をもちいて塩基配列特異的なプローブ／RecA／2本鎖標的DNA複合体を効率よく形成させるためには、試料中の全DNA（プローブ+2本鎖DNA）量に依存して RecA 量を最適化する必要がある。」とも記載されており（同特許の9～10ページ）、1.6mM のATP γ S、8fmol（100 μ l 中。この量はヌクレオチド残基のモル数では約0.46 μ M になる。同特許の10ページの43～49行）の1本鎖プローブ、0.32nM の2本鎖DNA存在下で、RecA 量を0.08～5.12 μ M に変化させた実験

により、その場合の最適 RecA 量が $0.32\mu\text{M}$ であり、 $0.16\mu\text{M}$ より下や $0.64\mu\text{M}$ より上の RecA 濃度では該プローブ/RecA/2本鎖標的DNA複合体の形成が低下したと述べている。従って、この場合のATP γ Sの分子数は、1本鎖プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の約3,500倍、また RecA タンパク質の分子数の2,500~10,000倍に相当する。

【0008】

上記のように通常は大過剰のATP γ S等の難分解性ヌクレオチドコファクター（最低でも、1本鎖プローブに含まれるヌクレオチド残基の分子数の10倍、また RecA タンパク質の分子数の30倍のATP γ S）が使用されている。本発明者らは、ATP γ S等の RecA 様組換え酵素自身が保有するATPase等のヌクレオシドトリホスファターゼ活性によって分解されにくい難分解性ヌクレオチドコファクターを使用する場合は、従来法のように大過剰に加える必要はなく、ATP γ S等の難分解性ヌクレオチドコファクターが大過剰存在するとむしろRecAタンパク質/1本鎖核酸プローブ/2本鎖標的核酸複合体形成の反応効率、収率や特異性に悪影響を及ぼすのではないかと考え、反応中に存在する、1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数や RecA タンパク質の分子数の何倍程度の該難分解性ヌクレオチドコファクターが存在するのが最適かを詳細に検討した結果、該難分解性ヌクレオチドコファクターの分子数が、1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、RecA 様組換え酵素の分子数の10倍以下、好ましくは5倍以下、より好ましくは3倍以下である条件下で、RecA 様組換え酵素（リコンビナーゼ）/1本鎖核酸プローブ（2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む）複合体（single-stranded nucleoprotein filament）を調製し、該複合体を2本鎖標的核酸を含む試料に接触させることによって、RecA 様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ/2本鎖標的核酸複合体を極めて効率よく且つ特異的に形成させることができることを見いだした。

【0009】

さらに、本発明者らは、調製したRecA 様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体を用いて2本鎖標的核酸に対し相同組換え反応を行う際に、1価のカチオン

を共存させることにより、該反応の精度 (fidelity) や特異性のみならず、反応効率や収量を著しく向上させることができることを見だし、これにより本発明を完成するに至った。

【0010】

本発明は、試料中の2本鎖標的核酸に高い反応性及び特異性を示すRecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ(2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む)複合体の調製方法、並びに該方法により調製されたRecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体の2本鎖標的核酸配列のターゲティング、濃縮(enrichment)、検出及び/又は単離への利用に関し、より詳しくは、

(1) 分子数が1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、かつ、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下である難分解性ヌクレオチドコファクターの存在下で、ホモプローブを含む1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え酵素とを反応させることを特徴とする、RecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体を調製する方法、

(2) 難分解性ヌクレオチドコファクターが $ATP \gamma S$ 、 $ADP \cdot AlF_4^-$ (ATP、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又はADP、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $dADP \cdot AlF_4^-$ (dATP、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又はdADP、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $ADP \cdot BeF_3^-$ (ATP、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又はADP、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、又は $dADP \cdot BeF_3^-$ (dATP、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又はdADP、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)である(1)に記載の方法、

(3) ホモプローブが、互いに十分に相補的な少なくとも2種類のホモプローブである、(1)に記載の方法、

(4) 1本鎖核酸プローブ試料が、ホモプローブと、少なくとも1種類のヘテロプローブとの混合物である、(1)~(3)のいずれかに記載の方法、

(5) 0.5~2.0mMの Mg^{2+} 存在下で1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え

酵素とを反応させる、(1)に記載の方法、

(6) RecA 様組換え酵素が原核生物由来である、(1)に記載の方法、

(7) RecA 様組換え酵素が大腸菌由来である、(1)に記載の方法、

(8) RecA 様組換え酵素が標識又はリガンドを有する、(1)、(6)、(7)のいずれかに記載の方法、

(9) ホモプローブが標識又はリガンドを有する、(1)～(7)のいずれかに記載の方法、

(10) (1)～(9)のいずれかに記載のRecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体の調製に用いるための、RecA 様組換え酵素及び難分解性ヌクレオチドコファクターを含むキット、

(11) 試料中の2本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮(enrichment)、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) (9)に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を2本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された2本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、及び

(c) 固相に捕捉されなかった2本鎖核酸及びプローブを除去する工程、を含む方法、

(12) 試料中の2本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) (9)に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を形質転換可能なベクターに挿入された2本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された2本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、

(c) 固相に捕捉されなかった2本鎖核酸及びプローブを除去する工程、

(d) 固相に捕捉された2本鎖標的核酸を含む画分を固相から遊離し、該2本鎖標的核酸を含む画分を適当な宿主細胞に形質転換する工程、及び

(e) 該2本鎖標的核酸を有する形質転換細胞を選択する工程、を含む方法、

(13) 標識又はリガンドが、ビオチン又はジゴキシゲニンである、(8)、(9)、(11)、(12)のいずれかに記載の方法、

(14) 固相が、アビジン(ストレプトアビジン)又は抗ジゴキシゲニン抗体を結合させた磁性ビーズ(マグネットビーズ)である、(13)に記載の方法、

(15) (8)又は(9)に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体を用いる、固定細胞試料中に存在する2本鎖標的核酸をインサイチュハイブリダイゼーション法によって検出する方法、

(16) (1)~(9)のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体を用いる、生細胞試料中に存在する2本鎖標的核酸をインビボ遺伝子ターゲティング法によってターゲティングする方法、

(17) 2本鎖標的核酸が2本鎖標的DNAである、(1)、(11)、(12)、(15)、(16)のいずれかに記載の方法、

(18) 1価のカチオン共存下でRecA 様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体と2本鎖標的核酸を含む試料とを反応させることを特徴とする、(11)~(16)のいずれかに記載の方法、

(19) 1価のカチオンがナトリウムイオン又はカリウムイオンである、(18)に記載の方法、

(20) ナトリウムイオンが150mM以下の塩化ナトリウム又は250mM以下の酢酸ナトリウムに由来し、カリウムイオンが150mM以下の塩化カリウム又は250mM以下の酢酸カリウムに由来する、(19)に記載の方法、

(21) (1)~(9)のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体を含む、試料中の2本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮(enrichment)、検出及び/又は単離するためのキット、を提供するものである。

【0011】

なお、本発明において「ホモプローブ(homologous probe)」とは、2本鎖標的核酸配列と十分な相補性を有する1本鎖核酸プローブを指し、「ヘテロプローブ(heterologous probe)」とは、2本鎖標的核酸配列と十分な相補性を有しない1本鎖核酸プローブを指す。また、本発明において、単に「プローブ」といっ

た場合には、ホモプローブ単独、またはホモプローブとヘテロプローブの混合物を指す。

【0012】

また、本発明において「難分解性ヌクレオチドコファクター」とは、RecA 様組換え酵素自身が保有する ATPase 等のヌクレオシドトリホスファターゼ活性によって分解されにくいヌクレオチドコファクターを指す。

【0013】

また、本発明において「2本鎖標的核酸」とは、ホモプローブが標的とする2本鎖核酸を指す。本発明において、単に「2本鎖核酸」といった場合には、2本鎖標的核酸及びホモプローブが標的としない2本鎖核酸の双方を含む。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明に使用し得る組換え酵素 (recombinase) とは、in vitro で相同的対合反応 (homologous pairing) 及び／又はDNA鎖交換反応 (strand exchange) を触媒し得る、大腸菌 RecA タンパク質と実質的に同等な RecA 様組換え酵素タンパク質の一群のことであり、多くの原核生物や真核生物から単離精製されている。例えば、大腸菌 RecA タンパク質の野生型 (T.Shibata ら、Methods in Enzymology、100、197、1983) 及びその変異型 (例えば RecA 803: M.Madiraju ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、85、6592、1988。RecA 441: H.Kawashima ら、Mol.Gen.Genet.、193、288、1984他)、その類似タンパク質である T4ファージ由来の uvsX タンパク質 (T.Yonesaki ら、Eur.J.Biochem.、148、127、1985)、枯草菌 (Bacillus subtilis) 由来の RecA タンパク質 (C.M.Lovett ら、J.Biol.Chem.、260、3305、1985)、黒穂菌 (Ustilago) 由来の Rec1 タンパク質 (E.B.Kmiec ら、Cell、29、367、1982)、Thermus aquaticus や Thermus thermophilus のような耐熱性菌由来の RecA 様タンパク質 (E.Angov ら、J.Bacteriol.、176、1405、1994。R.Kato ら、J.Biochem.、114、926、1993)、酵母、マウス、ヒト由来の RecA 様タンパク質 (A.Shinohara ら、Nature Genetics、4、239、1993) を包含する。

【0015】

大腸菌の RecA タンパク質は、常法（例えば、S.Kuramitsu ら、J.Biochem.、90、1033、1981。T.Shibata ら、Methods in Enzymology、100、197、1983。）により大腸菌から精製して使用し得る。又は、市販の RecA タンパク質（ベーリンガーマンハイム社製、プロメガ社製等）を使用し得る。また、大腸菌の RecA タンパク質の定量は、「extinction coefficient $\epsilon_{280}^{1\%} = 5.9$ 」（N.L.Craig ら、J.Biol.Chem.、256、8309-8044、1981）に基づいて行った。

【0016】

本発明に用いられる2本鎖標的核酸は、DNA、cDNAやRNA（DNA/RNAハイブリッド、2本鎖構造を有するRNA領域等）を包含し、その長さ、種類、形状等について特に制限はなく、環状（閉環状・開環状）、直鎖状いずれでも差し支えない。好ましくは、2本鎖標的核酸は2本鎖標的DNAである。原核生物や真核生物由来のジェノミックDNAやcDNA、ウイルスやファージ由来のDNA、及びそれらのジェノミックDNAやcDNAの断片、またそれらの各種DNAを含む各種のDNAライブラリー等のあらゆる種類の2本鎖DNAが使用され得る。また溶液中に存在する場合のみならず、常法により有機溶媒（メタノール、エタノール等）、酸（酢酸等）、や架橋剤（ホルマリン、パラホルムアルデヒド等）等で固定された細胞もしくは細胞構造体（細胞内に存在する、細菌、ウイルス、又は核やミトコンドリアなどの器官、染色体、あるいは、ウイルス、細菌などの血液サンプルなどの生体由来の試料に存在する寄生体を包含）や、固定されていない生細胞もしくは細胞構造体に含まれていてもよい。

【0017】

また、2本鎖標的核酸は必要に応じて、常法によりRI（ ^{32}P 、 ^{35}S 等）、蛍光色素（FITC、ローダミン等）、酵素標識（パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、化学発光剤（アクリジニウムエステル等）、ビオチンやジゴキシゲニン等の種々の標識又はリガンドによって、検出及び／又は分離のために標識され得る。

【0018】

本発明に用いられる1本鎖核酸プローブは、1本鎖の核酸であり、通常は1本

鎖のDNAが用いられる。形状については特に制限はなく、環状であっても直鎖状であっても差し支えない。1本鎖核酸プローブ試料は、標的配列と十分な相補性を有する1本鎖核酸プローブ（ホモプローブ）のみでもよいし、標的配列と十分な相補性を有しない1本鎖核酸プローブ（ヘテロプローブ）との混合物でもよい。ヘテロプローブを混合させることにより、特異性が向上することが知られている（PCT/JP97/03019）。使用する1本鎖核酸プローブの量は、該試料核酸の総量及びその中に含まれる該2本鎖標的核酸の量等に合わせて最適化する必要がある。

【0019】

本発明に用いられる前記「標的配列と十分な相補性を有する1本鎖核酸プローブ（ホモプローブ）」は、該標的配列の一部又は全体の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有する配列をその中に含んでいる1本鎖核酸であり、通常は該配列を含む1本鎖DNAである。通常ホモプローブは、2本鎖標的DNAとホモプローブとの間の塩基配列特異的な相同組換え反応（homologous pairingによるハイブリダイゼーション反応）を確実に実施するために、該2本鎖標的DNA配列の一部又は全体の塩基配列と少なくとも90%以上の相同性を有する配列をその中に含んでいることが好ましく、95%以上の相同性を有する配列をその中に含んでいることがさらに好ましい。

【0020】

該標的配列の一方又は両方の鎖に相補的な2本鎖核酸プローブを変性することによっても調製し得る。上記ホモプローブ鎖は、また、試料中のいずれのDNA鎖にも相補的でない末端伸張配列部分を含有し得る。2本鎖プローブの両方の鎖がこのような末端伸張配列部分を含有する場合は、これらの伸張部分は互いに相補的で有り得る。

【0021】

市販の多くの1本鎖又は2本鎖核酸プローブを使用し得る。あるいは、当該技術分野で公知のプローブ調製法により、例えば、該配列を有するプラスミドやコスミド又はその他のベクターから直接調製され得る。必要に応じて、ベクターからプローブ部分を制限酵素で切り出し、電気泳動によって特異的な制限酵素断片

を単離したり、PCR法によってプローブ部分のみを増幅することにより調製され得る。このようにして得られたプローブは通常2本鎖であるが、必要に応じてこれらを1本鎖に変性したり、M13ファージベクターのような1本鎖ベクターにサブクロニングして使用し得る。あるいはオリゴヌクレオチド合成法によって1本鎖プローブを調製し得る。長いプローブを調製する場合は、プローブのサブフラグメントを合成した後、それらのサブフラグメントをつなぎ合わせて調製され得る。

【0022】

前記ホモプローブが有すべき標的配列と相同な配列の長さは少なくとも15塩基以上であり、好ましくは25～2,000塩基であり、より長い(2,000塩基以上)ポリヌクレオチドプローブも使用され得る。

【0023】

また、ホモプローブは必要に応じて、常法によりRI (^{32}P 、 ^{35}S 等)、蛍光色素(FITC、ローダミン等)、酵素標識(パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、化学発光剤(アクリジニウムエステル等)、ビオチンやジゴキシゲニン等の種々の標識又はリガンドによって、検出及び/又は単離のために標識され得る。

本発明に用いられる前記「ヘテロプローブ」とは、標的配列と十分な相補性を有しない核酸プローブを指し、通常は1本鎖DNAである。標的配列以外の配列、例えば、標的配列が挿入されているベクター部分の配列等とは、相補性が低いことが好ましい。

【0024】

形状については特に制限はなく、環状であっても直鎖状であっても差し支えない。2本鎖核酸ヘテロプローブを変性することによっても調製し得る。

【0025】

例えば、該試料DNAがヒト由来DNAであるような場合は、ウイルスやバクテリオファージを含む種々の微生物由来の1本鎖核酸プローブ(好ましくはM13や ϕ X174等の1本鎖ファージDNAやラムダファージ由来のDNA断片を1本鎖化したもの)、ヒト以外の真核生物由来の1本鎖核酸プローブ(好ましくはサ

ケ精子やニシン精子由来のDNA断片を1本鎖化したもの)等をヘテロプローブとして使用し得る。また、ランダムな配列を有する適度な長さの合成DNA混合物もヘテロプローブとして使用し得る。

【0026】

ヘテロプローブは通常いかなる標識又はリガンドも有していない。前記ヘテロプローブの長さは少なくとも15塩基以上であり、好ましくは30~10,000塩基であり、より好ましくは60~7,000塩基であり、より長い(10,000塩基以上)ポリヌクレオチドプローブも使用され得る。

【0027】

尚、ホモプローブとヘテロプローブとを混合して使用する場合の両者の好ましい重量比は、約1:1から約1:500程度である。使用するホモプローブ及びヘテロプローブの総量や両者の重量比については、該試料核酸の総量及びその中に含まれる該2本鎖標的核酸の量等に合わせて最適化する必要がある。

【0028】

本発明に使用され得る難分解性ヌクレオチドコファクターとしては、 $ATP \gamma S$ 、 $ADP \cdot AlF_4^-$ (ATP・硝酸アルミニウム・フッ化ナトリウム混合物又はADP・硝酸アルミニウム・フッ化ナトリウム混合物)、 $dADP \cdot AlF_4^-$ (dATP・硝酸アルミニウム・フッ化ナトリウム混合物又はdADP・硝酸アルミニウム・フッ化ナトリウム混合物)、 $ADP \cdot BeF_3^-$ (ATP・硫酸ベリリウム・フッ化ナトリウム混合物又はADP・硫酸ベリリウム・フッ化ナトリウム混合物)や $dADP \cdot BeF_3^-$ (dATP・硫酸ベリリウム・フッ化ナトリウム混合物又はdADP・硫酸ベリリウム・フッ化ナトリウム混合物)が挙げられる(L.P.Moreau ら、J.Biol.Chem., 264, 2302-2306, 1989. A.J.Lange ら、J.Biol.Chem., 261, 101-107, 1986. S.C.Kowalczykowski ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 92, 3478-3482, 1995)。

【0029】

上記難分解性ヌクレオチドコファクターの分子数が、1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下、好ましくは5倍以下、より好ましくは3倍以下である条件下で、

ホモプローブを含む1本鎖核酸プローブ試料と RecA 様組換え酵素とを反応させることによって、試料中の2本鎖標的核酸のターゲティング、濃縮(enrichment)、検出及び／又は単離に適した RecA 様組換え酵素(リコンビナーゼ)／1本鎖核酸プローブ複合体(single-stranded nucleoprotein filament)を調製する。尚、ATP γ Sを使用する場合は、ATP γ Sの3～4倍量のADPを共存させてもよい。

【0030】

すなわち、前記ホモプローブ単独又はホモプローブとヘテロプローブの混合物を、通常予め約95～100℃で約5分間程度熱変性して1本鎖核酸プローブ試料を調製し、約20秒から1分間氷冷した後、前記 RecA タンパク質との結合反応に使用する。必要に応じて RecA タンパク質との結合反応前に約5～20秒間程度0～4℃で遠心する。変性によって1本鎖化されたプローブは-20℃のフリーザーで保存し得るが、好ましくは、氷水中で直ちに該1本鎖化プローブに上記の量比の該難分解性ヌクレオチドコファクターと RecA タンパク質とを標準的な RecA コーティング反応溶液[反応液中の各成分の最終濃度が以下の範囲になるように調製し得る；1～100mM(好ましくは10～35mM) トリス塩酸又は酢酸緩衝液(pH約7.5)、0.5～12.5mM(好ましくは0.5～2mM) 塩化マグネシウム又は酢酸マグネシウム、0～50mM 塩化ナトリウム又は塩化カリウム、もしくは0～100mM 酢酸ナトリウム又は酢酸カリウム、0～1mM ジチオスレイトール、0～100mM EGTA、0～50mM スペルミジン、0～10%グリセロール]中で混合する。混合液の総量としては、100 μ l以下が好ましく、5～40 μ l程度がより好ましい。この混合液を37℃で5～20分間保温することによって、1本鎖核酸プローブ試料に RecA タンパク質を結合させて RecA タンパク質／1本鎖核酸プローブ複合体(single-stranded nucleoprotein filament)を形成させる。

【0031】

上記のコーティング反応溶液には、少なくとも1本鎖核酸プローブを構成している4ヌクレオチド残基に対して1分子以上、好ましくは3ヌクレオチド残基に対して1分子以上の割合で RecA タンパク質を添加する必要がある、RecA タンパク質の総量については、使用する1本鎖核酸プローブ量のみならず、2本鎖標

的核酸を含む該核酸試料の総量等に合わせて最適化する必要がある。

必要に応じて、SSB (single-strand binding protein)、トポイソメラーゼ I やトポイソメラーゼ II などの共存下で実施し得る。

【0032】

また、場合によっては、1本鎖化された核酸プローブ、該難分解性ヌクレオチドコファクターと RecA タンパク質とを標準的な RecA コーティング反応溶液と混合する際に、同時に2本鎖標的核酸を含む試料核酸も加えて、RecA タンパク質/1本鎖核酸プローブ複合体の形成と、該複合体と2本鎖標的核酸との相同組換え反応 (homologous pairing) とを同時に行うことも可能である。ただし、その場合には Mg^{2+} の濃度を4 mM 以上にしておくか、スperlミジンを共存させるのが好ましい。

【0033】

また前記ホモプローブについては、W095/18236に記載されているような種々の標識又はリガンドを有する RecA タンパク質と結合させて標識又はリガンド付 RecA タンパク質/ホモプローブ複合体を調製して使用することもできる。ヘテロプローブについてはそのような種々の標識又はリガンドを有する RecA タンパク質との複合体を調製して使用することは好ましくない。

【0034】

上記のように本発明に従って調製された RecA タンパク質/1本鎖核酸プローブ複合体を、該2本鎖標的核酸が変性されない条件、例えば2本鎖核酸の変性がおこる温度以下で、該試料核酸に添加し、相同組換え反応 (homologous pairing) に適した条件下で、5分~24時間、好ましくは10分~2時間、37℃で反応させることによって、該2本鎖標的核酸と RecA タンパク質/1本鎖核酸プローブ複合体との複合体 (RecA タンパク質/1本鎖核酸プローブ/2本鎖標的核酸複合体) を形成させ得る。

【0035】

この相同組換え反応 (ハイブリダイゼーション反応) に適した反応条件とは、上記 RecA コーティング反応の条件とほぼ同じで、下記の反応溶液中で実施し得る。即ち、反応液中の各成分の最終濃度が以下の範囲になるように調製する。

1~100mM (好ましくは 10~35mM) トリス塩酸又は酢酸緩衝液 (pH約7.5)、 4~25mM (好ましくは 4~12.5mM) 塩化マグネシウム又は酢酸マグネシウム、 0~150mM 塩化ナトリウム又は 0~250mM 酢酸ナトリウム又は 0~150mM 塩化カリウム又は 0~250mM 酢酸カリウム、 0~1mM ジチオスレイトール、 0~100mM EGTA、 0~50mM スペルミジン、 0~10%グリセロール。

【0036】

相同組換え反応時に反応系に新たにヌクレオチドコファクターを添加する必要はない。相同組換え反応に使用する該 RecA タンパク質／1本鎖核酸プローブ複合体の量については、2本鎖標的核酸を含む該核酸試料の総量等に合わせて最適化する必要がある (米国特許第4,888,274号。PCT/JP97/03019)。

【0037】

本発明に従って調製したRecA様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を用いて2本鎖標的核酸に対し相同組換え反応を行う際に、1価のカチオン、例えば、150mM以下の塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は250mM以下の酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウムを共存させることにより、該反応の精度 (fidelity) や特異性のみならず、反応効率や収量を向上させることができる。添加する塩の種類や濃度は、2本鎖標的核酸の種類、形状 (閉環状、開環状、直鎖状) やホモプローブが有する標的配列と相同な配列の長さ等に合わせて最適化する必要がある。例えば、2本鎖標的核酸が閉環状の2本鎖DNAである場合には、25~150mMの塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は50~250mMの酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウムを共存させることにより、該反応の精度 (fidelity) や特異性のみならず、反応効率や収量を著しく向上させることができる。

【0038】

このことは、大過剰のATP γ SやATPの存在下で、RecAタンパク質／1本鎖DNAプローブ複合体の調製と2本鎖標的DNAとの相同組換え反応とを同時に行った場合に見られた「100mMの塩化カリウム存在下で相同組換え反応を行うと、プローブ／2本鎖標的DNA複合体の収量は変化せずに、精度 (fidelity) や特異性だけが向上する (V.A.Malkov ら、J.Mol.Biol., 271, 168-177, 1997)」とか、「DNA鎖交換反応 (strand exchange) は、50mMのナトリウム

塩によって部分的に阻害され、100mM の塩化ナトリウムもしくは 200mM の酢酸ナトリウム存在下ではほぼ完全に阻害される (L.J.Roman ら、Biochemistry、25、7375-7385、1986) 」とか、「Dループ形成反応 (D-loop formation) は、20mMの塩化ナトリウムによって20%阻害され、50mMの塩化ナトリウムによって完全に阻害される (T.Shibata ら、J.Biol.Chem.、256、7565-7572、1981) 」とかといった従来の知見とは、全く異なる新しい知見である。

【0039】

本発明に従って調製された RecA タンパク質／種々の標識もしくはリガンドを有するホモプローブ複合体、又は種々の標識もしくはリガンドを有する RecA タンパク質／ホモプローブ複合体と、それらを用いた相同組換え反応によって、2本鎖標的核酸との間で形成された複合体 (RecA タンパク質／種々の標識もしくはリガンドを有するホモプローブ／2本鎖標的核酸複合体、又は種々の標識もしくはリガンドを有する RecA タンパク質／ホモプローブ／2本鎖標的核酸複合体) や、RecA タンパク質／ホモプローブ複合体と、種々の標識又はリガンドを有する2本鎖標的核酸との間で形成された複合体 (RecA タンパク質／ホモプローブ／種々の標識又はリガンドを有する2本鎖標的核酸複合体) の検出又は単離は、公知の方法によって行い得る (米国特許第4,888,274号。W093/05177。W093/05178。W095/18236。M.Teintze ら、Biochem.Biophys.Res.Comm.、211、804-811、1995。PCT/JP97/03019等)。

【0040】

2本鎖標的DNAの好ましい濃縮、検出及び／又は単離方法としては、例えばビオチンで標識したホモプローブ (ビオチン標識ホモプローブ) と非標識ヘテロプローブとを適当な比率で混合して調製した1本鎖DNAプローブ試料、少なくとも1本鎖DNAプローブの4ヌクレオチド残基に対して1分子以上の RecA タンパク質、及び少なくとも1本鎖DNAプローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で RecA タンパク質の分子数の10倍以下 (好ましくは5倍以下、より好ましくは3倍以下) の分子数の、ATP、 γ S等の難分解性ヌクレオチドコファクターを、pH7.5で、0.5~2mMの Mg^{2+} が存在する条件下で37℃で反応させて RecA タンパク質／1本鎖核酸プローブ複合体を調製し、該複合

体を2本鎖標的DNAを含む試料核酸に加えて、4~12.5mMの Mg^{2+} 、150mM以下の塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は250mM以下の酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウム存在下で、37℃で相同組換え反応をさせた後、形成されたビオチン標識ホモプローブ/2本鎖標的DNA複合体をストレプトアビジン結合マグネットビーズ(ダイナル社製等)で捕捉し、捕捉されなかった2本鎖核酸やプローブを洗浄した後、ビーズに結合したビオチン標識ホモプローブ/2本鎖標的DNA複合体を、塩化ナトリウムを含有する溶液中で室温~85℃で約5~15分程度処理することによって該2本鎖標的DNAを含む画分を遊離(溶出)させる方法が挙げられる。また、このようにして回収された該2本鎖標的DNAを含む画分を、適当なベクターに挿入した後、適当な宿主細胞に形質転換し、該2本鎖標的DNAを有する形質転換細胞を選択し、該形質転換細胞から該標的DNAを回収することも可能である。尚、該2本鎖標的DNAが元々形質転換可能なベクターに挿入されている場合は、新たにベクターに挿入し直す必要はなく、そのまま形質転換に使用し得る。

【0041】

本発明に従って調製されたRecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体の利用法としては、まず、cDNAやジェノミックDNAの混合物から標的遺伝子を濃縮及び/又は単離し、そのクローニングを行うことや、種々の遺伝子ライブラリー(cDNAライブラリー、又は、コスミド、P1、BACやYAC等のジェノミックDNAライブラリー)から標的遺伝子をスクリーニングすることが挙げられる。

【0042】

また、標的DNA配列の増幅(米国特許第5,223,414号、W091/17267)や、オリゴヌクレオチドプローブを利用するRARE(RecA-assisted restriction endonuclease cleavage)法(L.J.Ferrin ら、Nature Genetics、6、379、1994)を含む種々の遺伝子マッピング(B.M.J.Revet ら、J.Mol.Biol.、232、779、1993)、オリゴヌクレオチドを利用する標的DNAの塩基配列特異的な修飾(メチル化やアルキル化など)や切断(M.Koob ら、Nucleic Acid Res.、20、5831、1992。E.I.Golub ら、Nucleic Acid Res.、20、3121、1992。A.M

ikhail ら、Biochemistry、34、13098、1995)にも利用することが可能である。

【0043】

また、cDNAやジェノミックDNA等の混合物を含む臨床検体から、特定の標的DNAを単離及び／又は検出することによる、各種遺伝子異常や変異の診断及び、種々の病原性微生物やウイルスによる感染症の診断にも利用可能である。

【0044】

さらには、本発明に従って調製された RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体は、W093/05177 や W095/18236 に記載されている RecA タンパク質を利用するインサイチュハイブリダイゼーション法にも利用可能であり、また、生細胞中での遺伝子ターゲティング (in vivo gene targeting) により遺伝子の改変や転写阻害等を行うことによる遺伝子治療法やトランスジェニック法 (米国特許第5,468,629号、W093/22443、E.I.Golub ら、Nucleic Acid Res.、20、3121、1992、E.I.Golub ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、90、7186、1993等)にも利用可能である。

【0045】

本発明はまた、本発明に従ってRecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を調製するためのキットを提供する。このキットには、適正な量のRecA 様組換え酵素及び難分解性ヌクレオチドコファクターが含まれる。また、例えば、ヘテロプローブを含んでいてもよい。

【0046】

本発明はさらに、本発明に従って調製した RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を含む、試料核酸中の2本鎖標的核酸のターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離するためのキットを提供する。このキットには RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体以外の他の要素として、例えば、反応停止液、未反応の2本鎖核酸や1本鎖核酸プローブを洗浄するための洗浄液、2本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を補足するための固相 (例えば、磁性ビーズなど)、及び／又は溶出液を含んでいてもよい。

【0047】

【実施例】

本発明を説明するために以下の実施例を示す。これらの実施例は、本発明の例示であり、本発明を限定するものではない。

【0048】

【実施例1】 標的DNA、非標的DNA、ホモプローブ及びヘテロプローブの調製

(1) 2本鎖標的及び非標的DNAの調製

環状の2本鎖標的DNAとしてヒトガン抑制遺伝子である p53 の全 cDNA 配列を含む全長6.6kb のプラスミド php53B (R.Zakut-Houri ら、EMBO J., 4, 1251, 1985)、環状の2本鎖非標的DNAとしてプラスミドベクターである pUC18 (2.7kb) を、それぞれ QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN GmbH 社製) を用いてこれらのプラスミドを含む大腸菌より精製した。

(2) ホモプローブの調製

p53 の cDNA の部分配列を有し、その 5' 末端がビオチン化されている 2本鎖 275bp のフラグメントを、5' 末端がそれぞれビオチン化されているプライマー「5'-CCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3'」(配列番号: 2 / 配列番号: 1 の塩基配列の 1~25 番目に対応する) 及び「5'-CGTGCAAGTCACAGACTTGGCTGTC-3'」(配列番号: 3 / 配列番号: 1 の塩基配列の 251~275 番目に対応する)、Taq ポリメラーゼを用いる標準的な DNA 増幅反応条件 (PCR 法) によって調製し、使用時に熱変性して 1 本鎖化したものをホモプローブとして用いた。p53 cDNA のこの領域の塩基配列を配列番号: 1 に示す。

(3) ヘテロプローブの調製

サケ精子由来の DNA (シグマ社製、Type III) を、常法 (T.Maniatis ら、Molecular Cloning) によりフラグメント化した後、熱変性して 1 本鎖化したものをヘテロプローブとして用いた。

【0049】

【実施例2】 ATP γ S 存在下での RecA タンパク質 / 1 本鎖 DNA プローブ複合体 (single-stranded nucleoprotein filament) の調製

実施例 1 (2) で調製した p53 の cDNA 配列の一部からなる 275bp の 5' 末端をビオチン化した 2 本鎖ホモプローブと、実施例 1 (3) で調製したヘテロプローブとを混合したものを、滅菌水又は TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH7.5) で希釈し、0.6ml 容量のマイクロ遠心チューブに入れて沸騰水中で 5 分間加熱処理することにより 2 本鎖プローブを変性した。チューブを氷水中に移して急冷した後、 $1.0\mu\text{l}$ の 10×コーティングバッファー [300mM Tris-HCl (pH7.5 at 37°C)、20mM MgCl_2 、4mM DTT、30%グリセロール]、 $1.0\mu\text{l}$ の ATP γ S (シグマ社製) 溶液 (種々の濃度に調製)、RecA タンパク質 (ベーリンガー・マンハイム社製) を加え、全量が $10\mu\text{l}$ になるように滅菌水で希釈して 37°C で 12 分間反応させることにより、種々の条件下で RecA タンパク質 / 1 本鎖 DNA プローブ複合体 (single-stranded nucleoprotein filament) の調製を行った。1 本鎖プローブ (ホモプローブ + ヘテロプローブ) 濃度 (プローブを構成するヌクレオチド残基のモル濃度。1M = 350g/l)、ATP γ S 濃度、RecA タンパク質濃度、ATP γ S / ヌクレオチド残基 (モル比)、ATP γ S / RecA タンパク質 (モル比) についての詳しい条件は表 1 に示す通りである。

【0050】

[実施例 3] RecA タンパク質 / 1 本鎖 DNA プローブ複合体を利用する 2 本鎖標的 DNA の単離 (標的 DNA : 非標的 DNA = 1 : 50,000)

A. 相同組換え (homologous pairing) 反応によるハイブリダイゼーション

$1.0\mu\text{l}$ の 10×反応バッファー [300mM Tris-HCl (pH7.5 at 37°C)、20mM MgCl_2 、4mM DTT、30%グリセロール]、 $1.0\mu\text{l}$ の 80mM MgCl_2 溶液、実施例 1 (1) で調製した 2 本鎖環状標的 DNA である php53B を 49pg、2 本鎖環状非標的 DNA である pUC18 を $1\mu\text{g}$ (標的 DNA と非標的 DNA のモル比は 1 : 50,000)、及び表 2 に示した濃度になるように必要に応じて NaCl、 CH_3COONa 、KCl や CH_3COOK 溶液を混合し、全量が $10\mu\text{l}$ になるように滅菌水で希釈したものと、実施例 2 で調製した RecA タンパク質 / 1 本鎖 DNA プローブ (ホモプローブ + ヘテロプローブ) 複合体 $10\mu\text{l}$ とを混合し (最終的な反応液量はいずれの場合も $20\mu\text{l}$)、該複合体存在下で 37°C で 45 分間反応させた後、EDTA (final 10mM 程度) を含む反応停止液を添加して反応を停止させた。各反応に使用した RecA タ

ンパク質／1本鎖DNAプローブ複合体の調製条件や、各反応に含まれる塩の種類 (NaCl、CH₃COONa、KCl、CH₃COOK) や濃度については表2に示す通りである。

B. 磁性ビーズによる捕捉／単離

ストレプトアビジンでコートされた磁性ビーズ (DYNAL社製) 20 μ l を0.6ml 容量のマイクロ遠心チューブに取り、磁性ビーズ分離ラック (MAGNA-SEP) を用いて100 μ l の30mM Tris-HCl、50mM NaCl (pH7.5) で2回洗浄した。洗浄液を除去後、これらの洗浄した磁性ビーズを含むマイクロ遠心チューブに、上記の反応液 (反応停止液を含む) を全量加えてよく混合し、室温で15分間放置して捕捉した。この間、2～3分間毎に攪拌した。磁性ビーズ分離ラックを利用してビーズを分離し、上清を除去した後、ホモプローブ／2本鎖標的DNA複合体が壊れない条件 (B. Rigas ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83、9591-9595、1986。M. Teintze ら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、211、804-811、1995等) で2～3回洗浄した。洗浄液を除去後、10 μ l の30mM Tris-HCl、200mM NaCl (pH7.5) を加えてビーズとよく混合した後、85℃で8分間処理した。磁性ビーズ分離ラックを利用して2本鎖標的DNAを含む上清を回収した。

C. トランスフォーメーション

野島らの方法 (H. Inoue ら、Gene、96、23、1990) にしたがって大腸菌 JM109 株より調製したコンピテントセル 100 μ l を1.5ml 容量のマイクロ遠心チューブに取り、Bで回収した上清 10 μ l を加えて混合後、氷中で30分間保冷した。

次に42℃で30秒間保温した後、氷中にもどして1～2分間冷却した。このチューブに0.5ml のSOC培地 (Bacto trypton 2%、Bacto yeast extract 0.5%、NaCl 10mM、KCl 2.5mM、MgCl₂ 10mM、MgSO₄ 10mM、グルコース 20mM) を加えて37℃で1時間振盪後、LBプレート [20～70 μ g/ml アンピシリン、1mg/プレート X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)、0.5～1.0mg/プレート IPTG (isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) を含む。] にスプレッドして37℃で一晩培養した。この条件では、2本鎖標的DNAである php53B をトランスフォームされた大腸菌は白色のコロニーを生じるが、非標的DNAである pUC18 をトランスフォームされた大腸菌は青色のコロ

ニーを生じる。

【0051】

種々の反応条件下で得られたトランスフォーメーションの結果を表2に示す。

【0052】

【表1】

[RecAタンパク質/1本鎖DNAプロープ複合体の調製条件]

条件	ATP γ S 濃度 (μ M)	1本鎖DNAプロープ濃度(μ M)		ATP γ S/3'末端残基 (モル比)	RecA 濃度 (μ M)	ATP γ S/RecA (モル比)
		純DNAプロープ	ベクターDNAプロープ			
A	6.0	1.0	29.0	1/5	6.0	1/1
B	6.0	1.0	29.0	1/5	12.0	1/2
C	7.5	1.0	29.0	1/4	7.5	1/1
D	7.5	1.0	29.0	1/4	15.0	1/2
E	10.0	1.0	29.0	1/3	10.0	1/1
F	15.0	1.0	29.0	1/2	15.0	1/1
G	20.0	1.0	29.0	2/3	10.0	2/1
H	50.0	1.0	29.0	1.67/1	10.0	5/1
I	100.0	1.0	29.0	3.33/1	10.0	10/1
J	300.0	1.0	29.0	10/1	10.0	30/1
K	500.0	1.0	29.0	16.7/1	10.0	50/1
L	2000	1.0	29.0	66.7/1	10.0	200/1

【0053】

【表2】

[トランスフォーメーション結果]¹⁾

No.	RecA/7 ⁺ φ ⁺ 複合体 調製条件	塩の種類	塩濃度 (mM)	白色コロニー数 (個)	青色コロニー数 (個)	特異性 (%) ²⁾
1	C	—	0	464	206	69.3
2	E	—	0	535	235	69.5
3	G	—	0	518	298	63.5
4	H	—	0	460	432	51.6
5	I	—	0	364	650	35.9
6	J	—	0	290	1518	16.0
7	K	—	0	271	2390	10.2
8	L	—	0	222	3742	5.6
9	A	NaCl	100	130	214	37.8
10	B	NaCl	100	256	204	55.7
11	C	NaCl	100	998	196	83.6
12	D	NaCl	100	1128	274	80.5
13	E	NaCl	100	1404	200	87.5
14	F	NaCl	100	1356	243	84.8
15	G	NaCl	100	1273	246	83.8
16	H	NaCl	100	1082	380	74.0
17	I	NaCl	100	806	640	55.7
18	J	NaCl	100	641	1325	32.6
19	K	NaCl	100	601	1624	27.0
20	L	NaCl	100	594	1773	25.1
21	E	NaCl	25	722	295	71.0
22	E	NaCl	50	798	194	80.4
23	E	NaCl	125	1182	148	88.9
24	E	NaCl	150	805	193	80.7
25	E	NaCl	50	1146	395	74.4
26	E	CH ₃ COONa	100	1932	376	83.7
27	E	CH ₃ COONa	200	1418	298	82.6
28	E	CH ₃ COONa	250	665	232	74.1
29	E	KCl	25	769	239	76.3
30	E	KCl	50	836	203	80.5
31	E	KCl	100	1471	226	86.7
32	E	KCl	125	1162	220	84.1
33	E	KCl	150	941	204	82.2
34	E	CH ₃ COOK	50	987	258	79.3
35	E	CH ₃ COOK	100	1526	300	83.6
36	E	CH ₃ COOK	200	1074	190	85.0
37	E	CH ₃ COOK	250	706	196	78.3

1): 同じ実験を3回ずつ繰り返して行ったデータの平均値を示す。

2): 特異性 (%) = 白色のコロニー数 ÷ (白色のコロニー数 + 青色のコロニー数) × 100
として表した。

No. 1 ~ 8 及び 11 ~ 20 の結果より、相同組換え反応 (ハイブリダイゼーション反応) 中にナトリウム等の塩が存在するしないにかかわらず、ATP γ S の分子数が、1本鎖DNAプローブを構成するヌクレオチド残基の分子数の 1/4 以上で、RecAタンパク質の分子数の10倍以下であるような条件下で調製したRecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体を用いて2本鎖標的DNAの単離を行った方

(No. 1~5、11~17) が、米国特許第4,888,274号に記載されているような量の ATP γ S (ヌクレオチド残基の分子数の10倍以上、RecAタンパク質の分子数の30倍以上、もしくは0.5~2 mM) 存在下で調製したRecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体を用いて行った場合 (No. 6~8、18~20) よりも、2本鎖標的DNAの収量、特異性ともにはるかに高かった。一方、ATP γ Sの分子数を、1本鎖DNAプローブを構成するヌクレオチド残基の分子数の1/5まで下げる (No. 9、10) と収量や特異性が低下した。

【0054】

以上の結果より、ATP γ Sの分子数が、1本鎖DNAプローブを構成するヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、RecAタンパク質の分子数の10倍以下であるような条件下で調製したRecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体が、2本鎖標的DNAの単離に最適であり、該複合体を用いて2本鎖標的DNAの単離を行うと、極めて高い収量と特異性が得られることが判明した。

【0055】

さらに、No. 1~8と11、13、15~20の結果を比較すると、相同組換え反応 (ハイブリダイゼーション反応) 中に100mMの塩化ナトリウムが存在する方が、2本鎖標的DNAの収量、特異性ともに著しく向上することがわかった。

【0056】

さらに、No. 13、21~24及びNo. 29~33の結果より、相同組換え反応 (ハイブリダイゼーション反応) 中に添加する塩化ナトリウム及び塩化カリウムの濃度は、150mM以下が好ましいことが判明した。一方、No. 25~28及びNo. 34~37の結果より、酢酸ナトリウム及び酢酸カリウムの濃度は、250mM以下が好ましいことが判明した。

【0057】

これらの結果より、2本鎖標的核酸が閉環状の2本鎖DNAである場合には、25~150mM程度の塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は50~250mM程度の酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウムの共存下で相同組換え反応を行うことにより、2本鎖標的DNAの単離の精度 (fidelity) や特異性のみならず、反応効率や収量も著しく向上したと言える。このことは、大過剰のATP γ SやATPの存

在下で、RecAタンパク質／1本鎖DNAプローブ複合体の調製と2本鎖標的DNAとの相同組換え反応とを同時に行った場合に見られた「100mMの塩化カリウム存在下で相同組換え反応を行うと、プローブ／2本鎖標的DNA複合体の収量は変化せずに、精度 (fidelity) や特異性だけが向上する (V.A.Malkov ら、J.Mol. Biol., 271, 168-177, 1997)」とか、「DNA鎖交換反応 (strand exchange) は、50mMのナトリウム塩によって部分的に阻害され、100mMの塩化ナトリウムもしくは200mMの酢酸ナトリウム存在下ではほぼ完全に阻害される (L.J.Roman ら、Biochemistry, 25, 7375-7385, 1986)」とか、「Dループ形成反応 (D-loop formation) は、20mMの塩化ナトリウムによって20%阻害され、50mMの塩化ナトリウムによって完全に阻害される (T.Shibata ら、J.Biol.Chem., 256, 7565-7572, 1981)」とかといった従来の知見とは、全く異なる新しい知見である。

【0058】

【発明の効果】

本発明により、試料中の2本鎖標的核酸に高い反応性及び特異性を示すRecA様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ (2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む) 複合体の調製することが可能となった。本発明の方法により調製されたRecA様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を利用すれば、効率的に2本鎖標的核酸配列のターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離を行うことができ、各種遺伝子異常や変異の診断、種々の病原性微生物やウイルスによる感染症の診断、遺伝子治療やトランスジェニック法への応用も可能である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIKIN INDUSTRIES, LTD.

<120> Method for preparing highly efficient RecA-like recombinase/sing

le-stranded nucleic acid probe complex and its use

<130> D2-001

<160> 3

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 275

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ccttgccgtc ccaagcaatg gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt	60
tcactgaaga cccaggtcca gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgcggtg	120
cccctgcacc agcagctcct acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggccccctgt	180
catcttctgt cccttcccag aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct	240
tgcattctgg gacagccaag tctgtgactt gcacg	275

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 2

ccttgccgtc ccaagcaatg gatga

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 3

cgtgcaagtc acagacttgg ctgtc

25

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の 2 本鎖標的核酸に高い反応性及び特異性を示す RecA 様組換え酵素 / 1 本鎖核酸プローブ複合体の調製方法、並びに該方法により調製された RecA 様組換え酵素 / 1 本鎖核酸プローブ複合体の利用を提供することを課題とする。

【解決手段】 分子数が、1 本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の 1 / 4 以上で、かつ、RecA 様組換え酵素の分子数の 10 倍以下である難分解性ヌクレオチドコファクターの存在下で、RecA 様組換え酵素（リコンビナーゼ） / 1 本鎖核酸プローブ複合体を調製し、該複合体を 2 本鎖標的核酸を含む試料に接触させることによって、RecA 様組換え酵素 / 1 本鎖核酸プローブ / 2 本鎖標的核酸複合体を極めて効率よく且つ特異的に形成させることができることを見いだした。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002853

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル

【氏名又は名称】 ダイキン工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002853]

1. 変更年月日 1990年 8月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル
氏 名 ダイキン工業株式会社